Journal of Plant Protection
Vol. 34, No. 2, Summer 2020, P. 145-152

نشریه حفاظت گیاهان (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۴، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۹، ص. ۱۵۲-۱۴۵

مقاله علمی-پژوهشی

بررسی کارایی روش‌های مختلف استخراج آر.ان.آ در شناسایی ویروس موزاییک کدو (*Squash mosaic virus*)

محدثه گرامی نوقابی[۱]- محسن مهرور[۲]*- محمد زکی عقل[۳]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۲/۰۹
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۲/۱۸

چکیده

تخریب اسید نوکلئیک در طی فرآیند استخراج آن از بافت گیاهی و نیز وجود مواد بازدارنده از عمده‌ترین معضلات خالص‌سازی ژنوم ویروس‌های گیاهی است. به منظور ردیابی موثر ویروس موزاییک کدو از بافت خربزه از مزارع آلوده، چهار روش مختلف استخراج RNA با یکدیگر مقایسه و روش استخراج اسیدنوکلئیک از این گیاه بهینه شد. کیفیت اسیدنوکلئیک استخراج شده به وسیله آزمون زنجیره‌ای پلی‌مراز با نسخه‌برداری معکوس و به کمک دو جفت آغازگر متفاوت تعیین شد. در بین روش‌های استخراج تفاوت چشمگیری وجود داشت به نحوی‌که بعضی از روش‌ها قادر به ردیابی ویروس از بافت گیاهی نبودند. در بین روش‌های مورد مقایسه، روش استخراج dsRNA با سلولز به علت خالص‌سازی انحصاری اسیدنوکلئیک ویروسی از بافت گیاه، بیشترین و بهترین اسیدنوکلئیک را در پی داشت و ردیابی ویروس در اغلب نمونه‌ها را ممکن می‌نمود.

واژه‌های کلیدی: استخراج اسید نوکلئیک، مقایسه، ویروس موزاییک کدو

مقدمه

حدود ۳۵ ویروس از روی کدوئیان در ایران گزارش شده است که تعداد زیادی از آن‌ها ایجاد بیماری‌های مهمی در کدوئیان می‌نمایند و اکثرا دارای دامنه میزبانی وسیعی هستند (۲ و ۱۸). در میان ویروس های خسارت‌زای کدوئیان، در سال‌های اخیر ویروس موزاییک کدو (*Squash mosaic virus*, SqMV) به دلیل گستردگی وسیع، چنین به نظر می‌رسد که روی کمیت و کیفیت محصولات تاثیر مهمی گذاشته و عملا بازارپسندی آن‌ها را کاهش داده است (۳ و ۱۴).

آزمون سرولوژی الایزا ELISA یکی از عمومی‌ترین روش‌های در شناسایی ویروس‌های گیاهی است (۱۶) اما عواملی مانند هزینه و زمان بر بودن آزمون، امکان اتصال غیر اختصاصی آنتی‌سرم با آنزیم‌ها و پروتئین‌های نامربوط و عدم انعطاف‌پذیری آنتی‌سرم‌های تولیدی از آزمونی به آزمون دیگر سبب شده است تا کارایی و محبوبیت این روش تا حد زیادی تحت تاثیر قرار گیرد (۲۰) بنابراین روش‌های مبتنی بر ژنوم مورد استفاده گسترده‌تر قرار گرفت. با توجه به این که روش مولکولی RT-PCR کارآمدترین و موثرترین روش برای شناسایی ویروس‌های RNA دار است (۵، ۸ و ۱۳)، لذا استخراج ژنوم از گیاه به عنوان اولین قدم در آزمون مولکولی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است به طوری‌که در این ویروس‌ها، استخراج ژنوم با کیفیت مناسب، لازمه موفقیت در کاربرد روش‌های مولکولی مانند RT-PCR است (۷).

اتصال RNA استخراج شده به پلی ساکاریدها و مواد فنلی موجود در رسوب موجب ناپایداری آن و عدم موفقیت در آزمایش‌های پایین دست از جمله RT-PCR می‌شود (۱۹).

RNA ویروسی SqMV اولین بار توسط Hebert و همکاران به وسیله روش پلی‌اتیلن گلیکول استخراج شد (۱۲)، بعد از آن Haudenshield روش مبتنی بر فنول-کلروفرم را برای این ویروس به کار برد (۱۱).

در سال ۱۹۶۷ Kammen در تحقیقات خود متوجه شد که روش استخراج آر. ان.آ ویروس‌های چند وجهی از جمله ویروس SqMV که مبتنی بر فنول و کلروفرم است، منجر به تخریب بخش‌های از ژنوم می‌شود و لذا این روش را برای استخراج این گروه ویروس‌ها مناسب ندانست (۲۳).

هم‌چنین پیشنهاد شده است که برای استخراج ژنوم کوموویروس ها روشی استفاده شود که بافر آن دارای pH=6 باشد، چرا که این

۱، ۲ و ۳- به‌ترتیب دانشجوی دکتری بیماری‌شناسی گیاهی و دانشیاران گروه گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
(*- نویسنده مسئول: Email: mehrvar@um.ac.ir)
DOI: 10.22067/jpp.v34i2.72088

شرایط از تجمع مواد قهوه‌ای بازدارنده جلوگیری می‌کند و نیز توصیه شده است که کلیه مراحل به سرعت انجام شود تا چسبندگی ویروس به حداقل برسد (۲۴).

ویروس موزائیک کدو (SqMV) یکی از اعضای جنس *Comovirus* و خانواده *Secoviridae* و زیر خانواده *Comovirinae* است که توسط بذر، سوسک و بصورت مکانیکی منتقل شده، باعث ایجاد بیماری‌های مهمی در دامنه وسیعی از گیاهان جنس *Cucurbita* و *Cucumis* می‌شود. این ویروس دارای ژنوم RNA تک رشته‌ای دوقسمتی است که هر کدام درون پروتئین پوششی جداگانه‌ای قرار می‌گیرند (۶ و ۱۰).

با توجه به اهمیت بالای کیفیت اسید نوکلئیک استخراج شده در انجام آزمون‌های مولکولی، در این پژوهش ما اقدام به مقایسه چندین روش متداول استخراج RNA ویروسی برای دستیابی به بهترین و کارآمدترین روش کردیم. بدین منظور چهار روش مختلف دو نوع متفاوت کیت تجاری استخراج RNA، استفاده از تریازول، استخراج dsRNA و روش استخراج با CTAB را از لحاظ کارایی و موفقیت در آزمون RT-PCR مورد مقایسه قرار دادیم.

مواد و روش‌ها

در طی بهار و تابستان سال ۱۳۹۶ از مزارع کشت خربزه خراسان جنوبی و رضوی تعداد ۲۵ نمونه گیاهی مشکوک با علایم آلودگی به SqMV جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل شدند.

استخراج RNA کل

RNA کل از برگ‌های دارای علایم آلودگی، به چهار روش مختلف خالص‌سازی شد.

۱- استفاده از کیت‌های تجاری استخراج RNA

در این روش ما از دو کیت متفاوت شامل کیت Column RNA Isolation Kit-I ساخت شرکت دنازیست آسیا مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده و هم چنین کیت تجاری RNeasy Mini Kit ساخت شرکت Qiagen نیز مطابق با دستورالعمل مربوطه RNA کل استخراج شد.

۲- روش CTAB

برای این منظور مطابق با روش ژانگ و همکاران (۴) RNA برگ‌های مشکوک به آلودگی استخراج شدند.

۳- روش GIT

در این روش محلولی مشابه Trizol در آزمایشگاه تهیه شد. برای این منظور ۳۸٪ فنول اسیدی، ۰٫۸ مول گوانیدین تیوسیانات، ۰٫۴ مولار آمونیوم تیوسیانات، ۰٫۱ مولار استات سدیم و ۵٪ گلیسرول در یک لیتر در آب مخلوط شده و پس از همگن شدن مخلوط در استخراج اسید نوکلئیک استفاده شد.

مقدار ۰٫۵ گرم از بافت گیاهی با استفاده از ازت مایع پودر شد و ۲ میلی‌لیتر تریازول به آن افزوده و ورتکس گردید. مخلوط حاصل برای ۵ دقیقه در ۷۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شده و به رونشین ۰٫۱ حجم استات آمونیوم و ۰٫۸ حجم ایزوپروپانول اضافه شد و برای ۳۰ دقیقه در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس لوله‌ها برای ۱۵ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد و رسوب حاصل پس از شستشو با الکل ۷۰ درصد در ۳۰ میکرولیتر بافر TE حل شد (۹).

۴- استخراج dsRNA

مطابق روش پیشنهادی Khankhum و همکاران که مبتنی بر استفاده از سلولز می‌باشد، اقدام به بهره‌گیری از این روش برای استخراج ویروس SqMV کردیم. بدین منظور مقدار ۰٫۵ گرم بافت گیاهی را در ازت مایع پودر کرده و سپس در بافری شامل تریس، EDTA و نمک حل کرده و ۵۰۰ میکرولیتر فنول، SDS[1] ۱۰٪ و بنتونیت ۲٪ به محلول افزوده و برای ۳ دقیقه در rpm۱۰۰۰۰ سانتریفیوژ کردیم. پس از این مرحله فاز رونشین را به میکروتیوب جدید انتقال داده و در نهایت با افزودن ۱۰۰ میلی‌گرم سلولز (سلولز C013 شرکت Sigma) RNA های دو رشته‌ای را خالص‌سازی کرده و پس از طی کردن مراحل شست و شو با الکل ۷۰ درصد، در ۳۰ میکرولیتر از بافر TE حل شدند (۱۵).

بهینه‌سازی آرتی-پی‌سی‌آر (RT-PCR)

برای سنتز رشته DNA مکمل (cDNA) ۳ میکرولیتر از آر.ان.آ استخراج شده با ۲ میکرولیتر آغازگر اختصاصی (S1-R) و (S2-R) و ۹٫۵ میکرولیتر آب دیونیزه مخلوط و میکروتیوب در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شد. سپس ۲ میکرولیتر مخلوط dNTPs، ۴ میکرولیتر بافر 5x واکنش و ۰٫۵ میکرولیتر آنزیم نسخه بردار معکوس (MMuLV-Reverse Transcriptase) به مخلوط اضافه گردیده و میکروتیوب به مدت ۱ ساعت در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد ترموسایکلر قرار گرفت. برای RNA استخرج شده به روش سلولز، پیش از این مرحله اسید نوکلئیک به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا دو رشته RNA از هم جدا شده و برای واکنش آماده گردد (۱۵).

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با استفاده از دو جفت آغازگرهای اختصاصی (۲۲) (جدول ۱) برای تکثیر بخش‌هایی از ژن پلی پروتئین RNA اول ژنومی و نیز ژن پوشش پروتئینی در RNA دوم ویروسی انجام شد. حجم نهایی واکنش ۲۰ میکرولیتر شامل ۳ میکرولیتر از cDNA، ۱ میکرولیتر از جفت آغازگرهای نام برده، ۲ میکرولیترPCR buffer ۱۰x، ۱٫۲ میکرولیتر $MgCl_2$ (۵۰ میلی‌مولار)، ۰٫۴ میکرولیتر مخلوط dNTPs و ۰٫۲ میکرولیتر Taq DNA Polymerase بود.

1- Sodium Dodecyle Sulfate (SDS)

پروفایل دمایی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز شامل یک چرخه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ دقیقه در مرحله واسرشت‌سازی، ۳۵ چرخه شامل ۹۴ درجه سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه، ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه و در نهایت یک سیکل ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه با استفاده از ترموسایکلر انجام گردید.

کلیه مراحل فوق برای هر دو جفت آغازگر تکرار شد.

به منظور بررسی نتایج RT-PCR، ۵ میکرولیتر از محصول PCR در ژل آگارز ۱ درصد حاوی ۲ میکرولیتر (۱۰٪ کل ژل) از Green Viewer الکتروفورز و در نهایت در دستگاه ژل داک عکس‌برداری شد.

جدول ۱- آغازگرهای اختصاصی SqMV در واکنش RT-PCR

Table 1- SqMV specific primers for RT-PCR reaction

آغازگر Primer	ژن Gene	محل اتصال Position	طول (جفت باز) Size (Base Pair)	توالی Sequence
S1_F	پلی پروتئین RNA1 Polyprotein RNA1	3341-3362	21	5'-CCACACACTACTTGGGATGTT-3'
S1_R	پلی پروتئین RNA1 Polyprotein RNA1	4658-4678	20	5'-AGGAGATTCATTCTCATGGT-3'
S2-F	پوشش پروتئینی RNA2 RNA2 Cp	1364-1388	24	5'-TGTGTACAAGATTGGTGGAGATGC-3'
S2-R	پوشش پروتئینی RNA2 RNA2 Cp	3359-3380	21	5'-AGGCTTCTAAAGCGAACTGGG-3'



شکل ۱- علایم برگ های خربزه آلوده به ویروس موزاییک کدو

Figure 1- Symptoms of melon leaves infected with SqMV

نتایج

علایم برگ‌های آلوده جمع‌آوری شده شامل موزاییک شدید، پیچیدگی و بدشکلی با علایم ذکر شده در منابع مطابقت دارد (۱۷ و ۷).

واکنش نسخه‌برداری معکوس و به دنبال آن آزمون PCR با هر دو جفت آغازگرهای رفت و برگشت (۲۲) در نمونه‌های جمع‌آوری شده، برای بررسی کارایی همه روش‌های مورد بررسی در ردیابی ویروس از بافت خربزه استفاده شد.

با استفاده از کیت تجاری شرکت Qiagen و آغازگرهای مربوط به بخش‌هایی از ژن پلی‌پروتئین RNA1 آلودگی حدود۱۴ نمونه (۵۶ درصد) در آزمون الکتروفورز محرز شد در حالی‌که با استفاده از کیت تجاری شرکت دنازیست تنها ۵ نمونه (۲۰ درصد) آلودگی را نشان دادند. آزمون مولکولی با استفاده از RNA استخراج شده به روش CTAB قادر به شناسایی ویروس SqMV در هیچ یک از نمونه‌ها نبود. آزمون مولکولی با استفاده از RNA استخراج شده به روش GIT نیز تنها در ۲ نمونه (۸ درصد) قادر به ردیابی ویروس مذکور بود.

در استفاده از روش dsRNA در ۱۶ نمونه (۶۴ درصد) از نمونه های جمع‌آوری شده قطعه ۱۳۰۰bp بخش‌هایی از پلی‌پروتئین SqMV همانندسازی شد که نشان‌دهنده‌ی کارآمدتر بودن این روش نسبت به سایر روش‌های مورد بررسی است.

نتایج برای استفاده از آغازگرهای مربوط به ژن پوشش پروتئینی RNA2 و قطعه ۱۹۰۰bp نیز تقریبا بر این نتایج مطابقت داشت (جدول ۲)، با این تفاوت که نتایج حاصل از الکتروفورز جفت آغازگر S1-F و S1_R دارای باندهای واضح‌تری بودند.

جدول ۲- میزان موفقیت روش‌های مختلف استخراج و نیز دو جفت آغازگر متفاوت در ردیابی ویروس SqMV

Table 2- The success rate of different extraction methods and two pairs of different primers in detecting the SqMV virus

روش استخراج Extraction methods	تعداد نمونه‌های مثبت با آغازگرهای S1 Positive samples with S1	تعداد نمونه‌های مثبت با آغازگرهای S2 Positive samples with S2
کیت استخراج آر. ان آ. شرکت دنازیست Dena Zist extraction RNA kit	5 (20%)	5 (20%)
کیت استخراج آر.ان.آ شرکت Qiagen Qiagen extraction RNA kit	14 (56%)	12 (45%)
استخراج dsRNA با سلولز Extraction RNA by cellulose	16 (64%)	15 (60%)
استخراج با CTAB Extraction by CTAB	0	0
روش GIT GIT method	2 (8%)	1 (4%)

بحث

هدف از این تحقیق مقایسه روش‌های استخراج اسیدنوکلئیک و بهینه‌سازی RT-PCR جهت ردیابی ویروس SqMV در بافت‌های گیاه خربزه با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز بود. از آن جا که روش مولکولی RT-PCR کارآمدترین و موثرترین روش برای شناسایی ویروس‌های RNA دار است (۵، ۸، ۱۳ و ۲۱). بسیار واضح است که استخراج ژنوم از گیاه به عنوان اولین قدم در آزمون مولکولی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است به طوری‌که استخراج RNA با کیفیت مناسب لازمه موفقیت در کاربرد روش‌های مولکولی مانند RT-PCR است (۷ و ۱۵). لذا روش استخراج باید ساده، کارآمد و اقتصادی باشد. از همین رو روش‌های مختلف استخراج از نظر توانایی در حذف ترکیبات بازدارنده واکنش RT-PCR مورد مقایسه قرار گرفتند.

نتایج این تحقیق نشان داد که روش استخراج dsRNA دارای بالاترین راندمان در استخراج اسیدنوکلئیک ویروس (۶۴ درصد) می باشد. از آن جا که این روش با کاربرد سلولز شکل دو رشته‌ای اسید نوکلئیک RNA را جذب و در نهایت خالص‌سازی می‌کند، لذا دارای کمترین میزان بازدارنده و اسیدنوکلئیک‌های گیاهی است (۱۵) و راندمان بالای این روش قابل انتظار بود.

روش CTAB برای استخراج ویروس SqMV کارایی لازم را نداشت، این امر نشان می‌دهد که بافر عصاره‌گیری این روش موثر نیست و شاید بتوان نتیجه گرفت که غلظت اسید نوکلئیک استخراج شده پایین بوده است. همچنین روش GIT مبتنی بر ساخت محلولی مشابه Trizol، نیز با هر دو جفت آغازگر S1 و S2 دارای راندمان اندکی در ردیابی ویروس بود که دلیل آن می‌تواند خرد شدن اسیدنوکلئیک به وسیله این محلول باشد که نتیجه آزمون مولکولی را به شدت تحت تاثیر قرار می‌دهد (۱).

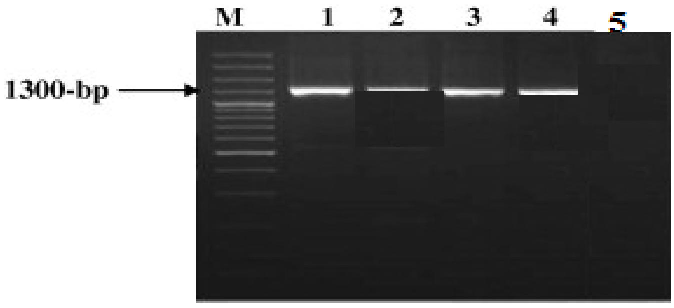
استخراج با روش کیت‌های تجاری شرکت داخلی دنازیست با ۲۰ درصد موفقیت می‌تواند نشان‌دهنده آن باشد که این روش قادر نیست به میزان قابل توجهی از اثر بازدارنده‌ها در خالص‌سازی اسیدنوکلئیک ویروس جلوگیری کند ولی کیت تجاری Qiagen با ۵۶ درصد موفقیت برای ردیابی ویروس SqMV نسبتا کارا و موثر است.

نتایج آزمون الکتروفورز نشان می‌دهد که آغازگرهای رفت و برگشت S1 که کدکننده بخش‌هایی از ژن پلی‌پروتئین RNA1 ویروس SqMV است، برای ردیابی ویروس موثرتر عمل می‌کنند. این امر می‌تواند به دلیل کوتاه‌تر بودن طول قطعه ژنی ناشی از این جفت آغازگر (۱۳۰۰bp) و یا اتصال بهتر این جفت آغازگر به ژنوم ویروس SqMV باشد.

با توجه به راندمان بالای روش استخراج dsRNA، امکان

استفاده از بافت خشک گیاهی که نگهداری طولانی مدت نمونه آلوده را امکان‌پذیر می‌کند، سادگی و زمان بر نبودن این روش (۱۵)، همگی دلایلی است که یک روش پیشنهادی موثر برای استخراج RNA از بافت گیاه خربزه برای استخراج ویروس SqMV باشد.

همچنین نتایج این تحقیق نشان داد که جفت آغازگر S1 می‌تواند آغازگری مناسب برای ردیابی ویروس SqMV در شناسایی اولیه این ویروس باشد.



شکل ۲- الکتروفورز محصول PCR با آغازگرهای اختصاصی ویروس SqMV (S1-F & S1-R). شماره ۱: روش dsRNA ۲: روش تریازول ۳: روش کیت تجاری Qiagen ٤: روش کیت تجاری دنازیست و ٥: روش CTAB

Figure 2- Results of RT-PCR using SqMV specific primer pairs (S1-F & S1-R). 1: Extraction dsRNA method; 2: Extraction using Triazol method; 3: Extraction using Qiagen kit method 4: Extraction using Dena Zist kit and 5: Extraction using CTAB method

منابع

1- Bahloul M., and Burkard G. 1993. An improved method for the isolation of total RNA from *spruce* tissues. Plant Molecular Biology Reporter 11: 212-215.

2- Bananej K., and Vahdat A. 2008. Identification, distribution and incidence of viruses in field grown cucurbit crops of Iran. Phytopathology Mediterranean 47: 247-257.

3- Campbell R.N. 1971. *Squash mosaic virus*. Description of plant viruses. Applied Biology 43-47.

4- Chang S., Puryear J., and Cairney J. 1993. A simple and efficient method for isolation RNA from Pine trees. Journal of Plant Molecular Biology 11: 113-116.

5- Fenby N.S., Scott N.W., Slater A., Elliott M.C. 1995. PCR and nonisotopic labeling techniques for plant virus detection. Cell Molecular Biology 41: 639–652.

6- Freitag J.H. 1956. Beetle transmission, host range, and properties of *Squash mosaic virus*. Phytopathology 46: 73-81.

7- Gambino G., Perrone I., and Gribaudo I. 2008. A rapid and effective method for RNA extraction from different tissues of grapevine and other woody plants. Phytochemical Analysis 19: 520–525.

8- Gawande S.J., Shukla A., Chimote V.P., Kaushal N., Kaunda P.I., Garg D., and Chimote, K.P. 2011. Development of PCR-Based Techniques for the Detection of Immobilised *Potato Virus Y* Virions. Journal of Plant Pathology 93: 127-132.

9- Gholampour Z., and Zaki Aghl M. 2016. Comparison of RNA extraction methods for identification of *Grapevine fan leaf virus*. Journal of Plant Protection 30: 127-133.

10- Goldbach R.W., and Wellink J. 1996. *Comoviruses*: molecular biology and replication. In The Plant viruses. Polyhedral Virions and Bipartite RNA Genomes 4: 35-76.

11- Haudenshield J.S., and Palukaitis P. 1998. Diversity among isolates of *squash mosaic virus*. Journal of Gen Virology 79: 2331–2341.

12- Hebert T.T. 1963. Precipitation of plant viruses by polyethylene glycol. Phytopathology 53: 362-365.

13- Henson J.M., and French R. 1993. The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis. Annual Review Phytopathology 31: 81–109.

14- Hull, R. 2002. Mathews Plant Virology. Academic press. New York.

15- Khankhum S., Escalante C., Rodrigues E., Souto R., and Valverde R.A. 2016. Extraction and electrophoretic analysis of large dsRNAs from desiccated plant tissues infected with plant viruses and biotrophic fungi. European Journal of Plant Pathology 53: 362–369.

16- Lequin R.M. 2005. "Enzyme Immunoassay (EIA)/Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Clinical Chemistry 51: 2415–2418.

17- Nelson M.R., and Knuhtsen H.K. 1973. *Squash mosaic virus* variability: review and serological comparisons of six biotypes. Phytopathology 63: 920–926.
18- Privvidenti R., Gonsalves D., and Humaydan H.S. 1984. Occurrence of *Zucchini yellow mosaic virus* in cucurbits from Connecticut, New York, Florida, and California. Plant Disease 68: 443-446.
19- Salzman R.A., Fujita T., Zhu-Salzman K., Hasegawa P.M., and Bressan R.A. 1999. An improved RNA isolation method for plant tissues containing high levels of phenolic compounds or carbohydrates. Plant Molecular Biology Reporter 17: 11-17.
20- Schmidt S.D., Mazzella M.J., Nixon R.A., and Mathews P.M. 2012. Measurement by enzyme-linked immunosorbent assay. Methods in Molecular Biology 849: 507–527.
21- Singh R.P. 1998. Reverse-transcription polymerase chain reaction for the detection of viruses from plants and aphids. Journal of Virological Methods 74: 125–138.
22- Svoboda J., and Leisova-Svobodova L. 2011. First report of *Squash mosaic virus* in ornamental pumpkin in the Czech Republic. Plant Disease 95(10): 1321-1321.
23- Van Kammen A. 1967. Purification and properties of the components of *cowpea mosaic virus*. Virology 31: 633–642.
24- Wellink J. 1998. *Comovirus* isolation and RNA extraction. Methods in Molecular Biology 81: 205-209.

Journal of Plant Protection
Vol. 34, No. 2, Summer 2020, P. 145-152

نشریه حفاظت گیاهان (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۴، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۹، ص. ۱۵۲-۱۴۵

Evaluation the Efficiency of Different Methods of RAN Extraction for the Identification of the *Squash Mosaic Virus*

M. Gerami Nooghabi[1]- M. Mehrvar[2]*- M. Zakiaghl[3]

Received: 29-04-2018
Accepted: 09-03-2019

Introduction: *Squash mosaic virus* (*SqMV*) is a member of the genus *Comovirus* in the family *Comoviridae*. It is a seedborne and beetle-transmitted virus infecting most plants in the genera *Cucurbita* and *Cucumis*. Like other *comoviruses*, *SqMV* has a bipartite positive-strand RNA genome consisting of RNA1 and RNA2, which are separately encapsidated in isometric particles of 28 nm in diameter. The genomes contain a poly (A) tail at the 3-terminus and the genome-linked viral protein (VPg) attached to the 5end. ELISA has been used widely in plant virus diagnosis but it has relatively low sensitivity which is not suitable for detection of trace amounts of the virus in single viruliferous aphid vectors and mix infection. By contrast, PCR is an effective and efficient tool for *in vitro* amplification of DNA templates and has been extensively used for the diagnosis of viral and subviral pathogens with DNA and/or RNA genomes. The polymerase chain reaction (PCR) and reverse transcription-PCR (RT-PCR) are powerful tools for highly sensitive detection of plant viruses with DNA and RNA. The first step in a successful PCR test is to have an extraction method and the major problem in RNA extraction is contamination by polyphenols and polysaccharides. So, in this study, we investigated the effectiveness of various extraction methods in identifying the *Squash mosaic virus*.

Materials and Methods:

Plant material and virus isolates RT-PCR and sequencing

Twenty-five samples of Melon from Khorasan Razavi and Jonubi provinces under the cultivation of Melon have been collected in spring and summer of 2017. The samples had typical virus types, severe mosaic spasms, complexity and deformity, and entered the process of extraction of the genome of the dandruff as a positive example. The leaves samples were used for different RNA extraction methods using Chang et al. method, Dena Zist and Qiagen Kit, Triasol and dsRNA cellulose method and were used directly or stored at minus 70 0C.

Two specific RT-PCR was set up for amplifying an amplicon of 1900 and 1300 bp in order to detect infected samples, as this region is conserved among all *SqMV* isolates, and determine the best method for extraction virus RNA. The *SqMV* partial coat protein gene and partial genome of RNA1 has been sequenced to confirm the results. Here, we employed the Chang et al. procedure which is based on CTAB buffer. We also followed the manufacturer's protocol to extract the genome by Dena Zist and Qiagen kit. Triasol is a mono-phasic solution of phenol and guanidine isothiocyanate. It is a ready-to-use reagent for the isolation of total RNA from cells and tissues. After addition of Triasol and chloroform, phase separation is created by centrifugation. RNA is present in the aqueous phase and can be recovered by precipitation with isopropanol or ethanol. The extraction protocol used for DsRNA is a modification of the non-phenol batch protocol reported by Morris et al. (1983) and was compared with two other dsRNA extraction protocols.

Results and Discussion: The destruction of the nucleic acid during the process of extracting from the plant tissue and the presence of inhibitory substances are the major problems in purifying the genome of the viral viruses. In order to effectively detect Squash mosaic virus from melon tissue at the contaminated fields, four RNA extraction methods were compared and then the nucleic acid extraction method was optimized. The quality of the nucleic acid was extracted by polymerase chain assay with reverse transcription and using two pairs of different primers. Among the methods of extraction, there were significant differences in the way that some of the methods were not able to detect the virus from the plant tissue. Among the investigated methods, the method of extracting dsRNA with cellulose resulted in the highest and most excellent nucleic acid due to the exclusive purification of the viral genomic from the plant tissue, making it possible to detect the virus in most of the samples. We concluded that the modified dsRNA extraction protocol is efficient, fast, economic, versatile, and requires small amounts of tissue. The protocol was successfully used to extract dsRNAs from the plants infected

1, 2 and 3- Ph.D. Student and Associate Professors of Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, respectively.
(*- Corresponding Author Email: mehrvar@um.ac.ir)

with acute and persistent viruses such as SqMV in Melon samples.

Keywords: Comparison, RNA extraction, *Squash mosaic virus*